

Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) sebagai Antikanker Payudara

Dwitiyanti

Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. Hamka, Jakarta Timur 13460

Email : dwity.farmasi@gmail.com

Abstrak

Daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) dapat digunakan sebagai sitotoksik. Penelitian sebelumnya telah dibuktikan bahwa daun jambu biji mengandung kuersetin dengan kadar 61,71% dan berpotensi sebagai sitotoksik. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak etanol 70% dari daun jambu biji terhadap sel kanker T47D. Metode yang digunakan yaitu dengan perhitungan langsung (*viable cell count*) sehingga diketahui nilai LC_{50} . Penelitian ini menggunakan larutan uji dengan 6 konsentrasi yaitu 130,62; 67,98; 35,98; 18,43; 9,56 & 5 µg/ml. Nilai LC_{50} yang diperoleh dari ekstrak etanol 70% dari daun jambu biji tersebut adalah sebesar 27,54 µg/ml. Hal ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun jambu biji memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D.

Abstract

Guava leaves are used as a cytotoxic. Previous research has demonstrated that guava leaves contained 61.71% of quersetin and has potential as an cytotoxic. The aim of this study was to determine the cytotoxic activity of 70% ethanol extract of guava leaves against cancer cells T47D. The method used direct counting (*viable cell count*) to obtained LC_{50} value. This study used a test solution with six concentrations that were 130.62; 67.98; 35.98; 18.43; 9.56 and 5 µg/ml. The LC_{50} value from the 70% ethanol extract of guava leaves was 27.54 µg/ml. The results suggested the extract of guava leaves has cytotoxic activity against T47D cells

Keywords: guava leaves, quercetin, cytotoxic

PENDAHULUAN

Kanker disebabkan oleh pertumbuhan sel jaringan tubuh tidak normal dan tidak terkendali. Sel kanker bersifat ganas, tumbuh cepat dan dapat menyebar melalui pembuluh darah dan pembuluh getah bening, sehingga dapat tumbuh dan bermetastatis di tempat lain (Departemen Kesehatan, 2007). Kanker payudara adalah kanker ganas yang berasal dari sel kelenjar, saluran kelenjar dan jaringan penunjang payudara, tidak termasuk kulit payudara. Setiap tahunnya penderita kanker payudara mencapai 1,1 juta perempuan dan jumlah ini merupakan 10% dari kasus baru dari seluruh kanker.

Kanker payudara adalah jenis kanker yang paling banyak ditemui pada wanita. Kanker jenis ini merupakan penyebab utama kematian pada wanita akibat kanker (Richie *et al.*, 2003). Peningkatan angka kejadian kanker payudara serta belum adanya terapi yang dianggap tepat untuk mengatasinya memicu peneliti untuk mengeksplorasi bahan-bahan alam yang dianggap potensial sebagai alternatif agen antikanker, salah satunya daun jambu biji.

Berdasarkan penelitian sebelumnya telah dibuktikan bahwa daun jambu biji mengandung kuersetin dalam kadar yang tinggi yaitu sebesar 61,71% (Karyani, 2005). Kuersetin (3,3',4,5,7-pentahydroxyflavone) dapat beraksi sebagai antikanker pada regulasi siklus sel, berinteraksi dengan

reseptor estrogen (ER) tipe II dan menghambat enzim tirosin kinase (Lamson *et al.*, 2000).

Pengobatan alternatif untuk penyakit kanker dapat dikembangkan dengan melibatkan evaluasi praklinik senyawa kimia untuk membuktikan aktivitas sitotoksiknya. Pengujian sitotoksik secara *in vitro* dengan sel sel T47D dapat digunakan sebagai penapisan awal untuk mendeteksi senyawa yang bersifat sitotoksik. Pengujian secara *in vitro* memiliki kelebihan jika dibandingkan dengan pengujian secara *in vivo* yaitu lebih cepat, lebih murah dan membutuhkan lebih sedikit zat uji (Harahap, 2007). Sel T47D diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. Sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penanganannya, dan memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas (Burdal *et al.*, 2000).

Pengujian uji sitotoksik pada kultur sel dilakukan dengan menggunakan metode perhitungan langsung. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel T47D menggunakan ekstrak etanol dari daun jambu biji.

METODE

Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak etanol daun jambu biji adalah toples kaca, mesin penggiling, timbangan analitik, gelas ukur, batang pengaduk, rotary evaporator, corong pisah, cawan porselen, lemari es, dan oven.

Alat untuk uji sitotoksitas terdiri dari *microplate* 96 sumur, *laminar air flow biological safety cabinet*, inkubator CO₂ 5%, autoklaf, tangki nitrogen cair, alat suntik, tabung eppendrof, tabung dan alat sentrifuse, membran filter steril berdiameter 0,2 µm, mikropipet, *blue tip*, *yellow tip*, alat-alat gelas, timbangan analitik, mikroskop, hemositometer, kamera digital.

Bahan

Simplisia. Simplisia yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jambu biji yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITRO) Bogor.

Sediaan uji. Sediaan uji yang digunakan yaitu ekstrak etanol 70% daun jambu biji.

Sel uji. Sel uji yang digunakan pada penelitian ini adalah sel T47D yang diperoleh dari Laboratorium Bioassay Departemen Kimia Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.

Bahan kimia yang digunakan dalam uji sitotoksitas. Etanol 70%, dimetil sulfoksida (DMSO), Medium kultur *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI 1640 Hybri-Max®, sigma), HEPES (Asam N-2-dihidroksietil-piperazin-N'-2-etana sulfonat, flow lab), Fetal Bovine Serum (FBS 10%) (Gibco), *Phosphat Buffer Saline* (PBS), HCl 0,1%, natriumkarbonat (Na₂CO₃), dinatrium hidrogen fosfat, kalium dihidrogen fosfat, natrium klorida, *tripan blue*, *aquibidest*, *trypsin*.

Pembuatan ekstrak etanol 70% daun jambu biji

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi yaitu dengan memasukkan 1 kg serbuk kering simplisia kedalam botol (maserator) kemudian ditambahkan etanol 70% ke dalam botol sampai seluruh simplisia terendam, botol ditutup rapat. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk agar zat aktif yang terdapat pada simplisia terlarut, kemudian didiamkan selama 18 jam. Dipisahkan maserat dengan menggunakan kertas saring, ulangi proses penyaringan sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Maserat yang diperoleh dipekatkan menggunakan vakum *rotary evaporator* pada suhu ± 50°C hingga kental. Ekstrak kental kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C untuk menghilangkan sisa pelarut agar didapatkan ekstrak kental yang bebas etanol (Departemen Kesehatan, 2008).

Pembuatan pereaksi

Media kultur RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*). Serbuk medium RPMI 1640 sebanyak 10,4 gram ditambahkan 2,0 gram Hepes, sebanyak 2,0 gram natrium bikarbonat dan 1 ml fungizon kemudian dilarutkan dalam 1 liter air suling steril. Larutan distabilkan pada pH 7,2-7,4 dengan menggunakan pH meter. Medium ini kemudian disaring menggunakan penyaring bakteri *syringe filter* 0,2 µm *membrane non pyrogenic*. Medium yang steril ini disimpan di dalam kulkas pada suhu 2-8°C.

Pembuatan larutan *Phosphat Buffer Saline* (PBS). Dinatrium hidrogen fosfat ditimbang 1,72 gram (Na_2HPO_4), kemudian ditambahkan 0,89 gram kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) dan 8,5 gram natrium klorida (NaCl) dilarutkan dalam aquades steril hingga 1 liter. Kemudian distabilkan pada pH 7,2 dengan menggunakan pH meter dan disterilkan dengan autoklaf.

Pembuatan larutan *Trypsin*. *Trypsin* ditimbang 0,250 gram dan ditambahkan PBS hingga 1 liter diaduk sampai larut. Setelah itu disaring dengan *syringe filter* 0,2 μm *membrane non pyrogenic* dan disimpan pada suhu $\leq 20^\circ\text{C}$.

Pembuatan *Tripan Blue*. *Tripan blue* ditimbang 0,25 gram kemudian dilarutkan dalam aquades steril ditambah 1 ml HCl 0,1 N diaduk sampai larut, dibuat volume menjadi 50 ml dengan menambahkan aquades steril.

Kultur sel (Doyle dan Griffiths JB 2000)

Pengaktifan sel T47D. Sel T47D diambil dari tabung nitrogen cair sebanyak satu ampul, kemudian dipindahkan pada suhu ruangan hingga cair. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung konikal steril yang berisi media cairan sel diambil sebanyak 1 ml lalu dimasukkan ke dalam tabung konikal dan ditambahkan 5 ml medium kultur (RPMI 1640) kemudian disuspensikan. Suspensi sel disentrifuse dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit.

Supernatan dituang sedangkan pelet disuspensikan dengan penambahan medium kultur (RPMI 1640) yang mengandung *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% hingga 6 ml. Kemudian dimasukkan ke dalam *flask* dan diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator CO_2 5 % selama 6 hari.

Pemanenan dan perhitungan sel T47D.

Setelah jumlah sel cukup, sel T47D dicuci tiga kali dengan 10 ml PBS. Kemudian ditambahkan 3 ml PBS dan 1 ml *trypsin* untuk melepaskan sel dari dinding *flask*. Sel dipindahkan dalam tabung konikal steril, ditambahkan medium hingga 10 ml, suspensi sel disentrifuse dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh dibuang, pelet disuspensikan dalam 10 ml media RPMI 1640 dihitung jumlah selnya menggunakan hemositometer dengan mencampurkan 20 μl suspensi sel dengan 180 μl *tripan blue* di bawah mikroskop. Sebanyak 10 μl campuran dipipet ditaruh pada permukaan kamar hitung dengan menyinggung pinggir kaca penutup. Biarkan kamar hitung terisi larutan perlahan-lahan sampai penuh. Sel diamati dengan pembesaran 100 kali.

Hitung seluruh sel terdapat dalam bilik hitung yang terdiri dari 25 kotak dihitung. Jika kepadatan sel melebihi yang dikehendaki suspensi sel diencerkan dengan media RPMI. Jumlah sel yang diperoleh dari keempat bidang besar diambil nilai rata-ratanya, kemudian dikalikan dengan faktor pengenceran dan faktor koreksi untuk setiap bidang besar (setiap bidang besar mempunyai volume 10^4 ml). Jumlah sel per ml dapat dihitung dengan cara:

$$\frac{n}{25} \times P \times 10^4 \text{ sel/ml} \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan:

- n : jumlah sel dalam 25 bilik
 4 : jumlah bilik hemositometer
 yang dihitung
 P : Faktor pengenceran
 10⁴: 10.000 sel/ml

Pembuatan larutan uji ekstrak jambu biji.

Ekstrak etanol 70% daun jambu biji ditimbang sebanyak 500 mg dan dilarutkan dalam labu 100 ml sehingga konsentrasi larutan induk 5000 µg/ml. Dari larutan induk dipipet sebanyak 1 ml dan ditambah pelarut 9 ml sehingga diperoleh konsentrasi 500 µg/ml kemudian dari larutan ini dibuat pengenceran dengan konsentrasi 130,62; 67,98; 35,38; 18,43; 9,56 dan 5 µg/ml. µg/ml untuk ekstrak etanol 70% daun jambu biji. Semua larutan uji dibuat dengan pengenceran bertingkat.

Uji sitotoksisitas dengan metode perhitungan langsung. Pengujian larutan sampel uji ekstrak etanol 70% dibuat sebanyak 6 konsentrasi yaitu: 130,62; 67,98; 35,38; 18,43; 9,56 dan 5 µg/ml. Masing-masing dimasukkan kedalam plate 96 sumuran sebanyak 100 µl, kemudian ditambahkan suspensi sel sebanyak 100 µl kedalam tiap sumuran, sehingga tiap sumuran berisi 200 µl larutan. Seri kadar dilakukan tiga kali replikasi (triplo) untuk mendapatkan hasil yang lebih valid, selanjutnya kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Untuk menghitung jumlah sel tiap sumuran diambil medianya sebanyak 50 µl kemudian ditambahkan 50 µl larutan biru tripan. Setelah kurang lebih

3 menit diresuspensi diambil 10 µl untuk dihitung jumlah selnya menggunakan hemositometer.

Kontrol

- 1) Sumur G1-G3 kontrol sel (kontrol negatif) = 100 µl media + 100 µl suspensi sel.
- 2) Sumur H1-H3 kontrol pelarut (DMSO) = 100 µl suspensi sel + 100 µl larutan DMSO

Larutan sampel uji ekstrak daun jambu biji

- 1) Sumur A1 – A3 perlakuan ekstrak etanol 70% daun jambu biji 65,31 µg/ml (100 µl larutan sampel uji ekstrak etanol dengan konsentrasi 130,62 µg/ml + 100 µl suspensi sel)
- 2) Sumur B1 – B3 perlakuan ekstrak etanol 70% daun jambu biji 33,99 µg/ml (100 µl larutan sampel uji ekstrak etanol dengan konsentrasi 67,98 µg/ml + 100 µl suspensi sel).
- 3) Sumur C1- C3 perlakuan fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% daun jambu biji 17,69 µg/ml (100 µl larutan sampel uji ekstrak etanol dengan konsentrasi 35,38 µg/ml + 100 µl suspensi sel).
- 4) Sumur D1- D3 perlakuan ekstrak etanol 70% daun jambu biji 9,21 µg/ml (100 µl larutan sampel uji ekstrak etanol dengan konsentrasi 18,43 µg/ml + 100 µl suspensi sel).
- 5) Sumur E1-E3 perlakuan ekstrak etanol 70% daun jambu biji 4,78 µg/ml (100 µl larutan sampel uji ekstrak

etanol dengan konsentrasi 9,56 µg/ml + 100 µl suspensi sel).

- 6) Sumur F1-F3 perlakuan ekstrak etanol 70% daun jambu biji 2,50 µg/ml (100 µl larutan sampel uji ekstrak etanol dengan konsentrasi 5 µg/ml + 100 µl suspensi sel).

Pengambilan data

Dari uji sitotoksitas ekstrak etanol 70% daun jambu biji dilakukan pengambilan data berupa perhitungan jumlah sel yang hidup dan sel yang mati. Sel yang hidup akan tampak berwarna bening dan sel

yang mati akan berwarna biru. Jumlah sel yang didapat dihitung persen kematiannya.

Analisis data

Uji sitotoksitas ekstrak etanol daun jambu biji dilakukan dengan pengambilan data berupa perhitungan jumlah sel yang hidup dan sel yang mati. Sel yang hidup akan tampak berwarna bening dan sel yang akan mati akan berwarna biru. Jumlah sel yang didapat kemudian dihitung persen kematiannya.

Persentase kematian sel dengan metode perhitungan langsung (*viable cell count*) dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ viabilitas} = \frac{\text{jumlah sel yang hidup}}{\text{jumlah sel yang mati} + \text{jumlah sel yang hidup}} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

$$\% \text{ kematian} = 100\% - \% \text{ viabilitas} \dots\dots\dots(3)$$

$$Y = a + bx \dots\dots\dots(4)$$

Keterangan

Y = persen kematian

X = konsentrasi

Persen kematian yang diperoleh dari masing-masing konsentrasi diubah kedalam angka probit menggunakan tabel probit. Data di atas dibuat persamaan regresi linier untuk melihat hubungan antar perlakuan dengan persen kematian sel.

Perhitungan dengan cara probit kedalam regresi linier, hasil disubstitusi dan antilogaritma dan hasil tersebut merupakan nilai LC_{50} .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perolehan ekstrak

Tabel 1. Hasil ekstraksi daun jambu biji

Keterangan	Jumlah
Daun jambu biji segar	7 kg
Daun jambu biji kering	1,2 kg
Serbuk daun jambu biji	1 kg
Ekstrak kental etanol 70% daun jambu biji	0,45 kg

Hasil penapisan fitokimia

Uji penapisan fitokimia dilakukan dengan menguji alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, dan triterpenoid. Pengujian dilakukan pada ekstrak etanol 70 % dan fraksi etil asetat. Hasil pengujian dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Perhitungan jumlah kepadatan sel

Kepadatan sel yang dihitung dengan hemositometer, diperoleh sebanyak 1058 sel dengan rata-rata 45 sel pada tiap bidang, sehingga diperoleh kepadatan sel dengan jumlah 42×10^5 sel/ml, pada tiap-tiap

Tabel 2. Hasil uji penapisan fitokimia ekstrak daun jambu biji

Penapisan	Ekstrak
Alkaloid	+
Saponin	+
Flavonoid	+
Tanin	+
Triterpenoid	+

Keterangan: (+) = ada

sumuran dimasukan sebanyak 100 μ l suspensi sel dengan kepadatan 84×10^4 .

Uji sitotoksisitas metode perhitungan langsung (*viable cell count*)

Persen kematian sel tertinggi dengan larutan uji ekstrak etanol 70% daun jambu biji

diinkubasi 24 jam pada konsentrasi 130,62 μ g/ml sebesar 88,52% maka berdasarkan perhitungan persamaan regresi linear diperoleh nilai LC_{50} sebesar 27,54 μ g/ml. Hasil persentase kematian sel ekstrak etanol 70% daun jambu biji terhadap sel T47D dapat dilihat pada tabel berikut ini:

Tabel 3. Persentase kematian Sel T47D pada ekstrak etanol 70% daun jambu biji inkubasi 24 Jam

Konsentrasi (µg/ml)	Log konsentrasi (X)	% Kematian	Probit (Y)
130,62	2,12	88,52	6,20
67,98	1,83	68,92	5,49
35,38	1,55	40,75	4,76
18,43	1,27	43,23	4,83
9,56	0,98	33,33	4,57
5,00	0,70	12,49	3,85

$Y = 1,454 X + 2,901$
 $r = 0,9560$
 $LC_{50} = 27,54 \mu\text{g/ml}$

Analisis data

Data hasil pengujian ekstrak etanol 70% daun jambu biji terhadap sel T47D kanker payudara pada inkubasi 24 jam dengan metode perhitungan langsung diperoleh hasil persentase kematian yang ditransformasikan ke dalam analisa probit untuk mendapatkan nilai LC_{50} .

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jambu biji segar yang diperoleh dari Balitro Bogor. Tanaman yang akan digunakan harus dideterminasi terlebih dahulu untuk mendapatkan identitas yang benar dari tanaman yang akan diteliti, maka dilakukan determinasi tanaman sehingga dapat memberikan kepastian tentang kebenaran tanaman tersebut.

Ekstraksi daun jambu biji dilakukan dengan cara maserasi karena maserasi merupakan cara yang sederhana dan mudah dalam pelaksanaannya. Teknik penyarian dengan metode maserasi dilakukan dengan merendam simplisia dengan cairan penyari tertentu.

Proses penyarian terjadi karena adanya perbedaan konsentrasi di luar dan di dalam sel, cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam dan di luar sel, maka larutan yang pekat didesak ke luar. Peristiwa ini terjadi berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Hasil identifikasi golongan kimia ekstrak etanol 70% daun jambu biji mengandung beberapa senyawa yang berkhasiat seperti alkaloid, saponin, flavonoid, tanin dan triterpenoid. Uji sitotoksitas dilakukan secara *in vitro* metode ini dipilih karena metodenya cepat, hanya memerlukan sedikit senyawa yang digunakan dalam pengujian, tidak memerlukan hewan uji, dan dapat memberikan informasi tentang potensi efeknya pada sel target secara langsung.

Sel yang digunakan dalam uji sitotoksik ini menggunakan sel T47D karena tujuan dari penelitian ini untuk mencari obat untuk kanker payudara yang berasal dari bahan alam. Sel T47D merupakan *continous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. *Continous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penanganannya, dan memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas. Medium yang digunakan untuk mengkultur sel T47D adalah media RPMI 1640, media ini mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel. Medium RPMI 1640 berguna untuk memberikan nutrisi yang dibutuhkan sel supaya sel dapat bertahan hidup dan dapat memperbanyak diri.

Pada pengujian sitotoksik pelarut yang digunakan untuk melarutkan ekstrak etanol 70% herba daun jambu biji adalah DMSO, DMSO dipilih karena tidak toksik terhadap sel. Metode perhitungan sel yang digunakan adalah metode perhitungan langsung di bawah mikroskop dengan menggunakan hemositometer. Penetapan jumlah sel yang bertahan hidup pada uji sitotoksitas ini dilakukan berdasarkan parameter kerusakan membran yang dilakukan menggunakan pewarna *tripan blue*. Jika sel kanker payudara T47D mati maka akan terjadi kerusakan membran, sehingga protein di dalam sel akan keluar dan akan berikatan dengan *tripan blue* sehingga sel yang mati akan tampak biru. Sedangkan sel yang hidup karena membran plasmanya masih utuh maka protein dalam sel tidak akan berikatan dengan *tripan blue* sehingga sel tampak terang bersinar.

Penelitian dilakukan dengan lama waktu inkubasi 24 jam, inkubasi 24 jam bertujuan untuk mengetahui nilai LC_{50} atau nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% serta menunjukkan ketoksikan suatu senyawa terhadap sel.

Pada larutan uji ekstrak etanol 70% daun jambu biji diperoleh nilai $LC_{50} = 27,54 \mu\text{g/ml}$. Hasil nilai LC_{50} yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 70% daun jambu biji memiliki sifat sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D yang masuk dalam rentang amat sangat toksik yaitu 5-50 $\mu\text{g/ml}$ dan memiliki potensi sebagai obat anti kanker.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol 70% daun jambu biji memiliki sifat sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan nilai LC_{50} pada inkubasi 24 jam sebesar 27,54 $\mu\text{g/ml}$ dalam rentang amat sangat toksik yaitu 5-50 $\mu\text{g/ml}$ dan memiliki potensi untuk obat sitotoksik.

DAFTAR ACUAN

- Burdall, E.S., Hanby, M.A., Landsdown, R.J.M., Speirs, V. (2003). *Breast cancer cell line. Breast Cancer Research*. 5(2), 89-95
- Departemen kesehatan RI. (2007). *Pedoman penemuan dan penatalaksanaan penyakit kanker tertentu di komunitas*. Jakarta : Bakti Husada

- Departemen Kesehatan RI. (2000). *Buku panduan teknologi ekstrak*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan; Hlm. 3, 6, 17, 39
- Doyle, A., Griffiths, J.B. (2000). *Cell and tissue culture for medical research*. New York: John Wiley & Sons
- Harahap, Y. (2007). Uji sitotoksitas sediaan jadi daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl) terhadap sel MCF-7 secara *in vitro*. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 6 (2)
- Karyanti, D.E. (2005). Perbandingan kadar quercetin dan pola generik 35 varietas jambu biji (*Psidium guajava* L.). *Skripsi*. Jakarta: UHAMKA
- Lamson. *et al.* (2000). *Antioxidants and cancer III: Quercetin, Alternative Medicine*. Review. Volume 5 Number 3
- Richie, R. C and Swanson, J. (2003). Breast cancer: A Review of the Literature. *Journal of Insurance Medicine*, 35, 85–101